

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05236

研究課題名(和文) ガン診断を指向したテロメア鎖長計測用ソフトマテリアルの創製

研究課題名(英文) Development of soft materials in telomere DNA length sensing for cancer diagnosis

研究代表者

山口 勲 (Yamaguchi, Isao)

島根大学・学術研究院環境システム科学系・教授

研究者番号：00272708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：側鎖にアルキルシトシンとアルキルアンモニウム塩構造をもつカチオン性オリゴフルオレン(OF-1)と側鎖にアルキルシトシンとアルキルカルボン酸塩構造をもつカチオン性オリゴフルオレン(OF-2)を合成した。OF-1水溶液の発光強度は、テロメアDNA：(TTAGGG)_m (T=チミン、A=アデニン、G=グアノシン；m=2, 3, 4, 6)の添加量に比例して減少した。OF-1とは対照的に、OF-2水溶液にテロメアDNAを一定量ずつ添加すると、凝集誘起発光増大現象により、発光強度が増大した。OF-1とOF-2の計測精度は6であり、PCRが不要で、数分でテロメアDNA鎖長の計測が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのがん細胞では、テロメラーゼと呼ばれる酵素が活性化されており、テロメアDNAの短縮にともなう細胞分裂の停止が起きない。したがって、テロメラーゼ活性(テロメア鎖長)を測定することで、がんに関する診断ができる。既存のテロメア鎖長計測法では、計測に長時間を要すること、計測精度があまりよくないこと、検体(テロメアDNA)の増幅が必要となる場合があることなどの改善点が指摘されている。

本研究では、計測精度が6と高精度かつPCRが不要で、蛍光測定時間内(数分)でテロメアDNA鎖長の計測が可能なセンサー用材料を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：In this work, we developed a sensing method for telomere DNA chain length measurements based on newly synthesized water-soluble cationic and anionic oligofluorenes (OFs) bearing N1-alkylcytosine side chains. The sensing performance of the OFs surpasses that of previously reported sensors, they are capable of detecting (TTAGGG)_m (m = 2, 3, 4 and 6) chain lengths consisting of several bases, within several minutes. The chain lengths are determined by monitoring luminescence changes in the OFs, which will be discussed in this manuscript. Moreover, the present sensing method requires pico-mol scale of DNA amounts to detect the chain lengths; hence, it does not necessitate PCR amplification. We believe that the present sensing method will be of interest to your journal readers as it is expected to be applicable for sensing DNA chain lengths of various proteins and viruses in addition to that of the single-stranded overhang of telomere DNA, while avoiding PCR amplification.

研究分野：高分子化学、有機機能材料

キーワード：テロメアDNA センサー 発光性有機物質 シトシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

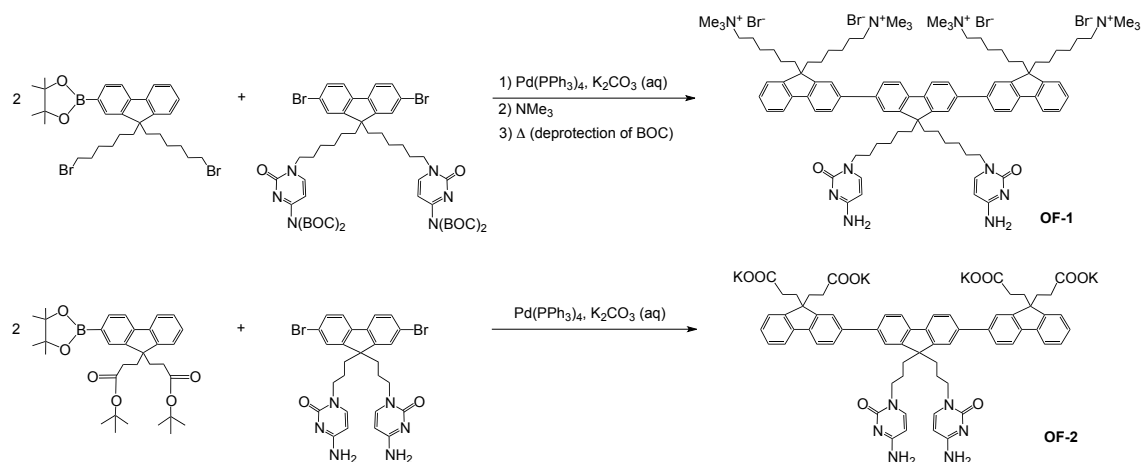
ヒトの染色体末端に位置するテロメアは、TTAGGG (T: チミン, A: アデノシン, G: グアニン) が繰り返し配列した 10 kb (10,000 塩基) 程の DNA で、その末端は一本鎖となっている。通常の体細胞では、テロメア DNA は細胞分裂の度に短くなり、細胞は分裂の限界に達する。一方、多くのがん細胞では、テロメラーゼと呼ばれる酵素が活性化されており、テロメア DNA の短縮にともなう細胞分裂の停止が起きない。したがって、テロメラーゼ活性 (テロメア鎖長) を測定することで、がんに関する診断ができる。このため、これまでに、数種類のテロメア鎖長計測法が開発されている。しかし、既存法では、計測に長時間を要すること、計測精度があまりよくないこと、検体 (テロメア DNA) の増幅が必要となる場合があることなどの改善点が指摘されている。

2. 研究の目的

現在、基礎および臨床分野で最もよく使われているテロメア鎖長測定法である **Telomere Repeat Amplification Protocol** アッセイ法 (TRAP アッセイ法) は、ゲル電気泳動を必要とするため、結果を得るまでに約 5 時間もの長時間を要し、テロメア鎖長の計測精度は、kb (キロ塩基) のオーダーである。また、TRAP アッセイ法は、**Polymerase Chain Reaction (PCR)** による増幅が阻害される場合に、正確な測定結果が得られないという欠点もある。したがって、PCR を必要としない方法の開発が求められている。そこで本研究では、極微量 (ピコモル) のサンプルでも計測可能とすることで PCR を必要とせず、短時間でテロメア鎖長を精度良く測定できるシステムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

側鎖にアルキルシトシンとアルキルアンモニウム塩構造をもつカチオン性オリゴフルオレン (**OF-1**) と側鎖にアルキルシトシンとアルキルカルボン酸塩構造をもつアニオン性オリゴフルオレン (**OF-2**) を、Pd 錯体触媒を用いたカップリング反応を利用して合成した (下式)。**OF-1** と **OF-2** の構造は、¹H NMR, IR 測定などにより決定した。**OF-1** または **OF-2** の超純水溶液中に、一定量のテロメア DNA; (TTAGGG)_m (m = 2, 3, 4, 6) を添加したときの蛍光スペクトルの強度変化をモニタリングした。



4. 研究成果

OF-1 水溶液の発光強度は、 $(\text{T TAGGG})_m$ ($m = 2, 3, 4, 6$)の添加量に比例して減少した (図 1; $m = 4$ の場合)。この結果は、ドナー(**OF-1**)とアクセプター(DNA中の核酸塩基)間で光誘起電荷移動(PCT)が起こったことで説明できる。つまり、ドナーの LUMO に光励起したスピンは、PCT によりアクセプターの LUMO に移動する。このスピンは、閉殻しているアクセプターの HOMO に移動することができず、結果として消光する (図 1 中)。**OF-1** の HOMO と LUMO レベルが T, A, G のそれらよりも高いことは、サイクリックボルタンメトリーと UV-vis 測定から確認した。テロメア DNA 添加による **OF-1** の発光強度の変化を、Stern-Volmer プロットしたものを図 2 に示す。**OF-1** のテロメア DNA 添加による蛍光強度の減少は、テロメア DNA 鎖長が短い方が顕著であった。この結果は、テロメア DNA 鎖長が長くなることでコンホメーションが複雑になり、**OF-1** と相互作用しにくくなったためと考えた。

OF-1 とは対照的に、**OF-2** 水溶液に $(\text{T TAGGG})_m$ ($m = 2, 3, 4, 6$)を一定量ずつ添加すると、凝集誘起発光増大(AIEE)現象により、発光強度が増大した。テロメア DNA 添加による **OF-2** の発光強度の変化を、Stern-Volmer プロットしたものを図 3 に示す。**OF-2** のテロメア DNA 添加による蛍光強度の減少は、テロメア DNA 鎖長が長い方が顕著であった。この結果から、**OF-2** がテロメア DNA 添加によって凝集したのは、**OF-2** とテロメア DNA を構成する核酸塩基が水素結合を形成したためと考えた。**OF-2** で AIEE が起こることは、**OF-2** の良溶媒(水)と貧溶媒(アセトン)の割合を変えた溶液の蛍光強度が、貧溶媒の割合が大きくなるにつれて増大したことにより確認した(図 4)。

【まとめ】

本センシングシステムでは、PCR が不要で、蛍光測定時間内 (数分) でテロメア DNA 鎖長の計測が可能であった。また、 $(\text{T TAGGG})_m$ 添加による **OF-1** と **OF-2** の発光強度変化が DNA 鎖長(m)に依存したことから、**OF-1** と **OF-2** のテロメア DNA 鎖長計測精度は 6 であり、既存法の精度 (数千塩基) と比較して、圧倒的に高精度であることがわかった。

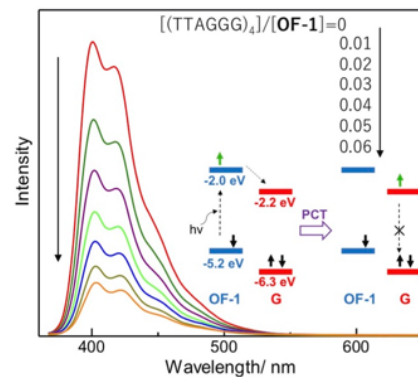


図 1 DNA 添加による **OF-1** の発光強度変化

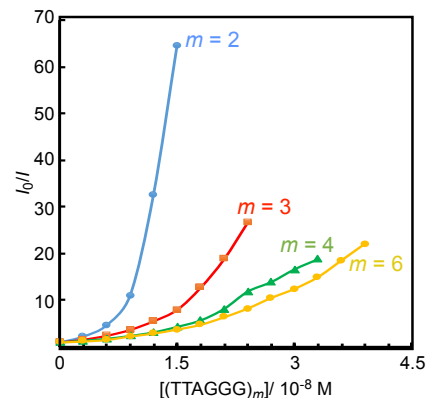


図 2 **OF-1** の Stern-Volmer プロット

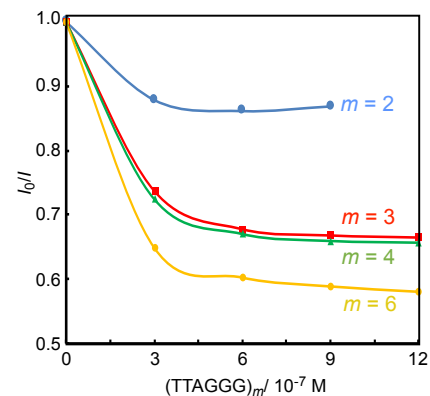


図 3 **OF-2** の Stern-Volmer プロット

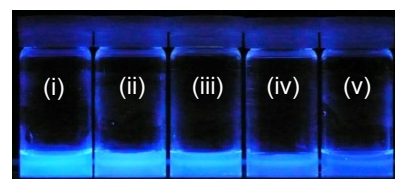


図 4 **OF-2** 水溶液に 365 nm の光を照射したときの写真。水/アセトン = 40/60 (i), 60/40 (ii), 70/30 (iii), 90/10 (iv) and 100/0 (v)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 I. Yamaguchi, G. Nagase, A. Wang	4. 巻 119
2. 論文標題 Synthesis and Chemical Properties of Conjugated Polymers with Bis(trifluoromethanesulfonyl)imide and Bis(nonafluorobutanesulfonyl)imide Anions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. Polym. J.	6. 最初と最後の頁 359-366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eurpolymj.2019.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 I. Yamaguchi, Y. Hamada, K. Miyoshi, A. Wang	4. 巻 68
2. 論文標題 Metal-chloride-Anion Containing Polymers with Expanded pi-Conjugation Systems Derived from Through-Space Interactions in the Piperazinium Ring	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polym. Int.	6. 最初と最後の頁 886-892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pi.5778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 I. Yamaguchi, S. Kinugawa, A. Wang	4. 巻 76
2. 論文標題 Synthesis and chemical properties of pyrophosphoric acid-doped polyaniline and copolymers of o-phenylenediamine with aniline and 3,4-ethylenedioxythiophene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polym. Bull.	6. 最初と最後の頁 4035-4046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00289-018-2590-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 I. Yamaguchi, M. Iwasaki, A. Wang	4. 巻 235
2. 論文標題 Synthesis of Polyethyleneimines Protonated by 1-Pyrenesulfonic Acid and Their Usability for Solubilization of Single-walled Carbon Nanotube	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mater. Lett.	6. 最初と最後の頁 80-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matlet.2018.10.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大江遼河、王傲寒、山口勲
2. 発表標題 側鎖にシトシル基をもつフルオレン重合体の合成と物性および機能
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福本大貴、王傲寒、山口勲
2. 発表標題 グラフェン可溶化剤として機能する1-ポリエーテル-2-ビレニルベンズイミダゾールの合成
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本雄大、王傲寒、山口勲
2. 発表標題 ポリエチレンイミン架橋体の空間的電子相互作用を利用した共役系の拡張
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田智子、王傲寒、山口勲
2. 発表標題 天然由来高分子と導電性高分子の複合体の合成および性質評価
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------